

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-32769

(43)公開日 平成11年(1999)2月9日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 12 N 15/09	ZNA	C 12 N 15/00
C 07 K 14/48		C 07 K 14/48
C 12 N 1/21		C 12 N 1/21
5/10		C 12 P 21/02
C 12 P 21/02		C 12 N 5/00

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全14頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平9-194672

(71)出願人 000002819

大正製薬株式会社

東京都豊島区高田3丁目24番1号

(22)出願日 平成9年(1997)7月22日

(72)発明者 吉本 真

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製
薬株式会社内

(72)発明者 矢崎 まどか

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製
薬株式会社内

(72)発明者 松本 佳代

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製
薬株式会社内

(74)代理人 弁理士 北川 富造

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規遺伝子とそれにコードされる蛋白質

(57)【要約】

【課題】ヒト大脳皮質由来の神経細胞賦活化活性を有する蛋白質HUCEP-3と、それをコードする遺伝子hucep-3を提供する。

【解決手段】ヒト大脳皮質由来のcDNAライブラリーからのクローニングによって神経細胞賦活化活性を有する新規蛋白質HUCEP-3をコードする遺伝子hucep-3が得られ、該遺伝子を有する発現ベクターによる形質転換体の培養により、新規蛋白質HUCEP-3が得られる。該蛋白質は、神経細胞賦活化活性物質として、医薬又は医薬の開発に用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の(a)または(b)の蛋白質；
 (a)配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質；
 (b)配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経細胞機能賦活化活性を有する蛋白質。

【請求項2】請求項1に記載の(a)または(b)の蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項3】以下の(a)または(b)のDNAからなる遺伝子；
 (a)配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNA；
 (b)配列番号：2のDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ神経細胞機能賦活化活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項4】請求項2または請求項3に記載の遺伝子を含有する組み換えベクターを含む形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術】本発明は、神経細胞機能に対して賦活化活性を有する、新規蛋白質HUCEP(Human Cerebral Protein)-3、該蛋白質をコードする遺伝子hucep-3、該遺伝子を発現させるための組み換えDNA、および組み換えDNAによって得られる形質転換体に関するものである。

【0002】

【従来の技術】神経変性疾患の多くは、神経細胞または神経細胞間の信号伝達に異変が生じることにより、神経細胞が死滅し発症するとされている。

【0003】このような神経変性疾患の代表例として、パーキンソン病やアルツハイマー病が挙げられる。パーキンソン症は、黒質神経細胞が変性して神経伝達物質の一つであるドーパミンが産成されなくなり、ドーパミン作動性の神経細胞が死ぬことにより発症すると言われている。一方、アルツハイマー病は主に大脳皮質や海馬の神経細胞が死ぬことによって痴呆症状を呈するとされている。

【0004】以上に述べた疾病に対しては、その原因が明確にされていないことから有効な治療薬がなく、対症療法しか行えないのが現状であり、現在これらの疾患とともにう神経細胞死の原因を明らかにすべく多くの研究がなされているが、未だ解明されていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】上記諸疾患の原因であると考えられる神経細胞死のメカニズムを解明し、これに関与する蛋白質並びにそれをコードする遺伝子を特定することは、神経細胞死に起因する疾患の根本的な治療薬を探索する上で、きわめて重要なことである。例えば、神経細胞死に関与する蛋白質それ自体に有効な医薬

となり得る可能性があることは勿論、このような蛋白質は、該蛋白質の機能と同様の機能を有する物質、当該機能を阻害または促進する作用を有する物質等を医薬として開発するに際しても、極めて有用である。以上の観点から、神経細胞死に関与する蛋白質とその機能の解明が望まれている。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、神経細胞の生存あるいは神経細胞の機能の維持に関与する蛋白質の同定を目的とし、ヒト脳組織で特異的に発現している遺伝子にコードされている蛋白質の中から、所望の神経細胞機能の維持に関与する蛋白質を把握するべく鋭意研究の結果、新規蛋白質HUCEP-3の存在とそれをコードする遺伝子hucep-3の単離に成功した。そして、このHUCEP-3が神経細胞機能賦活化活性を有し、神経変性疾患に関与するものであることを突き止め、本発明を完成するに至った。

【0007】即ち、本発明は、(a)配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、または(b)配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経細胞機能賦活化活性を有する蛋白質、に関するものである。

【0008】さらに本発明は、上記(a)または(b)に表された蛋白質をコードする遺伝子、に関するものである。

【0009】さらに本発明は、(c)配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNA；または、(d)配列番号：2のDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ神経細胞機能賦活化活性を有する蛋白質をコードするDNAからなる遺伝子、に関するものである。

【0010】さらに本発明は上記遺伝子を含有する組み換えベクターを含む形質転換体、に関するものである。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明の遺伝子は、ヒト大脳皮質由来のcDNAライブラリーから、該遺伝子を含んだcDNA断片として単離することができる。本発明者らが使用したcDNAライブラリーは、クローンテック社から市販されているヒト大脳皮質のmRNAをもとに調製したものであるが、ストラタジーン社から市販されているヒト大脳皮質のmRNAをもとにしても、同様にcDNAを調製することができる。上述のcDNAライブラリーにおいて、ヒト脳組織で特異的に発現している遺伝子を有すると思われるcDNAを識別する方法として、大久保らの方法(Okubo et al., Nature Genet., 2, 173 (1992))による、遺伝子発現の出現頻度を解析する方法を用いることができる。具体的には、ヒト大脳皮質のmRNAを錆型とし、適当な制限酵素で開環させたベクタープラスミド

の一端にオリゴdTを結合させたものをプライマーとしてcDNA合成を行った後、制限酵素MboIと制限酵素BamHIで切断する。当該ベクターはdamメチラーゼ陽性の大腸菌を宿主として調製されたため、MboIの認識配列である「GATC」のA残基がメチル化されている。従ってMboIは新たに合成されたcDNA部分のみを切断する。当該ベクターはオリゴdTを結合させた末端とは反対側の末端近傍にBamHI切断部位を1ヶ所だけ有しているので本酵素は当該ベクターを1ヶ所切断し、さらに新たに合成されたcDNA部分にもしBamHI認識配列が存在すれば、その部位も切断する。BamHIとMboIは「GATC」なる配列からなる、同一の付着端を生ぜしめるため、両酵素で切断した後、DNAリガーゼを作用させれば、プラスミドを閉環することができる。

【0012】本方法においてはこのようにして調製したプラスミドを用いて大腸菌を形質転換することによってcDNAライブラリーを構築した。従って当該ライブラリーは各mRNAの3'端のポリア部位から、その5'側部分のうち最初にGATCなる塩基配列が出現する部位までの領域を含んでいる。当該cDNAライブラリーから無作為に適当個数の組換え体を選択し、各組換え体中のcDNAを抽出してその全塩基配列を決定する。本法は、このようにして決定された特定配列を有するcDNA断片が、無作為に選択された組み換え体の中から幾つ確認されるかをもって、臓器特異的遺伝子及び高発現遺伝子を識別する方法である。本法において、組み換え体cDNAの抽出並びにcDNAの塩基配列の決定は、いずれも当業者にとって自体公知の各種操作方法(Molecular Cloning, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989、その他当業者にとって標準的な方法を紹介した技術解説書等に記載の方法、以下常法とする)により行うことができる。

【0013】尚、高発現遺伝子を識別する方法では、無作為に選択する組み換え体の総数は数百から千程度が適当であるが、必要ならばそれ以上の個数の組み換え体を処理すればよい。本発明者らは上記方法を実施し、770個の組み換え体中のcDNA断片の塩基配列を全て決定し、その中から、同一の配列を有するcDNAとしての出現頻度が2/770であったcDNA断片を、ヒト脳で特異的に発現している遺伝子を有するDNA断片の候補として選別した。

【0014】上記cDNA断片は前述したとおり、mRNAの3'端の一部の領域しか含んでいない。そこで本発明者らは当該領域(以下3'断片)の塩基配列情報を元にして、全鎖長cDNAを取得した。上記3'断片をプローブとして、クローンテック社から市販されているヒト大脳皮質cDNAライブラリーをブラークハイブリダイゼーションで、常法に従ってスクリーニングすること

によって行った結果、約1.4kbのDNA断片を増幅することができた。この際、錆型としてはストラタジーン社から市販されているヒト大脳皮質cDNAライブラリーを用いることもできる。

【0015】上記方法によって取得したクローンを大腸菌を宿主とすることによって増殖せしめ、常法に従ってラムダファージ粒子を調製した。当該ファージ粒子からDNAを抽出して、制限酵素EcoRIで切断し、ストラタジーン社から市販されているベクター、pBlue script IIを同様にEcoRIで切断したものに組み込んで、全塩基配列を決定した。これらの操作は全て常法に従った。

【0016】上記方法によって選別したcDNA断片中に存在すると思われる遺伝子が、脳組織で特異的に発現していることの確認は、該cDNA配列の臓器特異的な発現頻度をノーザンハイブリダイゼーションで確認することで行うことができる。具体的には、クローンテック社またはストラタジーン社から市販されている、ヒトの各臓器から抽出したmRNAをアガロースゲル電気泳動で分画し、メンブレンフィルターに転写した後、上記方法によって選別したcDNA断片をプローブとして、常法に従ってハイブリダイゼーションを行った。本発明者らはこの方法を用い、該cDNA配列の発現についての臓器特異性を調べた。その結果、脳以外の他の臓器、器官、細胞等でも該cDNA配列の多少の発現が認められたものの、それに比べ大脳皮質で特異的に発現していたことを確認した。

【0017】このことは、該cDNA配列中に、ヒト脳で特異的に発現し正常な脳機能の維持に必須である所望の遺伝子が存在することを、強く示唆するものである。

【0018】塩基配列中の蛋白質をコードする領域(ORF, open reading frame)の存在は、塩基配列をコンピュータープログラムを用いて解析する汎用の方法により確認することができる。該cDNA配列の中に目的とする遺伝子の存在を確信した本発明者らは、コンピューターを利用して該配列中にORFを見だし、この遺伝子を遺伝子hucep-3(human cerebral proteinの略)、該遺伝子をコードされる蛋白質をHUCEP-3と命名した。

【0019】遺伝子hucep-3は、配列番号:2に示される498塩基対(bp)からなる遺伝子である。この遺伝子hucep-3を用い、適当な宿主ベクター系による一般的な遺伝子組み換え技術によって、組み換え遺伝子を調製することができる。適当なベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pUC118その他)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pC194その他)、酵母由来のプラスミド(例、pSH19その他)、さらにバクテリオファージやレトロウィルスやワクシニアウィルス等の動物ウィルス等が利用できる。組み換えに際しては、適当な合成

DNAアダプターを用いて翻訳開始コドンや翻訳終止コドンを付加することも可能である。さらに該遺伝子を発現させるために、遺伝子の上流に適当な発現プロモーターを接続する。使用するプロモーターは、宿主に応じて適宜選択すればよい。例えば、宿主が大腸菌である場合には、T7プロモーター、lacプロモーター、trpプロモーター、λPLプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合にはSPO系プロモーター等が、宿主が酵母である場合にはPHO5プロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等が、宿主が動物細胞である場合にはSV40由来プロモーター、レトロウイルスプロモーター等が、それぞれ使用できる。

【0020】また該遺伝子を他の蛋白質（例、グルタチオンSトランスフェラーゼ、プロテインAその他）との融合蛋白質として発現させることも可能である。このようにして発現させた融合型HUCEP-3は、適当なプロテアーゼ（例、トリオブンピクチンその他）を用いて切り出すことが可能である。

【0021】HUCEP-3の発現の際に利用できる宿主としては、エシレヒニア属菌であるEscherichia coliの各種菌株、バチルス属菌であるBacillus subtilisの各種菌株、酵母としてはSaccharomyces cerevisiaeの各種菌株、動物細胞としてはCOS-7細胞、CHO細胞、PC12細胞等が利用できる。

【0022】上記組み換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換する方法としては、常法または各宿主細胞に対して一般に用いられる形質転換方法が適用できる。

【0023】本発明者らは、pGEX-4T2（ファルマシア社製）を発現ベクターとして遺伝子hucep-3を組み換え、HUCEP-3発現ベクター、pGEhucep3を調製した。このpGEhucep3を用い、常法に従って形質転換したEscherichia coli DH5/pGEhucep3は、平成9年2月4日に工業技術院生命工学技術研究所に寄託番号FARM P-16062として寄託されている。

【0024】更に本発明者らは、pREP10（インビトロジェン社製）を発現ベクターとして遺伝子hucep-3を組み換え、HUCEP-3を培養動物細胞内で発現させるためのベクター、pREhucep3を調製した。このpREhucep3を用い、ギブコ社のLIPOFECTAMINE試薬を利用して、神経細胞PC12を形質転換し、形質転換体、PC12/pREhucep3を調製した。形質転換された細胞は、用いたベクターに存在する選択マーカー、または適当な選択マーカーを付与又は削除し、これら選択マーカーの有無に基づいて識別することにより、単離することができる。本発明者らが行った、PC12細胞をpREhucep3で形質転換した場合には、抗生素質ハイグロマイシンB耐性を指標として形質転換体を識別、単離することができ

る。

【0025】上記操作の結果得られた形質転換細胞内の目的遺伝子の発現は、実施例において後述するよう、ノーザンハイブリダイゼーションにより確認することができる。宿主として用いた神経細胞PC12およびベクターであるpREP10を導入したPC12細胞を通常の増殖培地からNGF（神経細胞成長因子）を除去した培地に移すと細胞死を起こすが、pREhucep3により形質転換された神経細胞PC12は、NGF除去培地でも生育することが、例えばMTT（3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide）法（Mossman, T., J. Immunol Methods 65, 55-59 (1985)）により確認された。

【0026】新規蛋白質HUCEP-3は、配列番号：1に示されるごとく、総数166個のアミノ酸残基からなる、分子量17994ダルトンの蛋白質である。前述のように、遺伝子hucep-3を含有する組み換えベクターで形質転換させた神経細胞PC12が、NGF（神経細胞成長因子）の非存在下において有意に高い生存率を示したことから、HUCEP-3は神経細胞機能賦活化活性を有する生理活性蛋白質であることが確認された。

【0027】尚、本発明においては、配列番号：2に示したDNA配列の他に、該DNAとハイブリダイズしあつ神経細胞機能賦活化活性を有する生理活性蛋白質をコードするDNAも、本発明の範囲内である。

【0028】すなわち、遺伝子hucep-3の全長配列において、種々の人為的処理、例えば部位特異的変異導入、変異剤処理によるランダム変異、制限酵素切断によるDNA断片の変異・欠失・連結等により、部分的にDNA配列が変化したものであっても、これらDNA変異体が遺伝子hucep-3とストリンジンドな条件下でハイブリダイズし、かつ神経細胞機能賦活化活性を有する生理活性蛋白質をコードするDNAであれば、配列番号2に示したDNA配列との相違に関わらず、本発明の範囲内のものである。

【0029】また、配列番号：2に示したDNA配列と僅かに異なる配列からなる遺伝子が、ヒト染色体上に遺伝子hucep-3とは別個に存在する可能性もあり得るが、この場合においても、そこにコードされる蛋白質が神経細胞機能賦活化活性を有する生理活性蛋白質であれば、上記人為的変異体と同様に本発明の範囲内のものである。

【0030】上記のDNA変異の程度は、遺伝子hucep-3のDNA配列と90%以上の相同性を有するものであれば許容範囲内である。また、遺伝子hucep-3とハイブリダイズする程度としては、通常の条件下（例えばDIG-DNA Labeling kit

(ベーリンガー・マンハイム社製 Cat No. 1175033)でプローブをラベルした場合に、32°Cの DIG Easy Hyb 溶液(ベーリンガー・マンハイム社製 Cat No. 1603558)中でハイブリダイズさせ、50°Cの0.5×SSC 溶液(0.1% [w/v] SDSを含む)中でメンブレンを洗浄する条件(1×SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウムである)でのザザンハイブリダイゼーションで、遺伝子 hucep-3 にハイブリダイズする程度であればよい。

【0031】また、上記のごとく遺伝子 hucep-3 と相同性の高い変異体遺伝子にコードされる蛋白質であって、神経細胞機能賦活化活性を有する生理活性蛋白質もまた、本発明の範囲内のものである。

【0032】すなわち、新規蛋白質 HUCEP-3 のアミノ酸配列の 1 もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された変異体であっても、該変異体が神経細胞機能賦活化活性を有する蛋白質であれば、該変異体は本発明の範囲内のものである。

【0033】蛋白質の構成要素となるアミノ酸の側鎖は、疎水性、電荷、大きさなどにおいてそれぞれ異なるものであるが、実質的に蛋白質全体の 3 次元構造(立体構造とも言う)に影響を与えないという意味で保存性の高い幾つかの関係が、経験的にまた物理化学的な実測により知られている。例えば、アミノ酸残基の置換については、グリシン(Gly)とプロリン(Pro)、Gly とアラニン(Ala)またはバリン(Val)、ロイシン(Leu)とイソロイシン(Ile)、グルタミン酸(Glu)とグルタミン(Gln)、アスパラギン酸(Asp)とアスパラギン(Asn)、システイン(Cys)とスレオニン(Thr)、Thr とセリン(Ser)または Ala、リジン(Lys)とアルギニン(Arg)、等が挙げられる。

【0034】従って、配列番号：1 に示した新規蛋白質 HUCEP-3 のアミノ酸配列上の置換、挿入、欠失等による変異蛋白質であっても、その変異が HUCEP-3 蛋白質の 3 次元構造において保存性が高い変異であって、その変異蛋白質が HUCEP-3 と同様に神経細胞機能賦活化活性を有する生理活性蛋白質であれば、これらは本発明の範囲内にあるものと言うことができる。変異の程度としては、配列番号：1 に示したアミノ酸配列との相同性が、90%以上のものが許容し得る範囲である。

【0035】

【発明の効果】 HUCEP-3 が神経細胞賦活化活性を有していることから、遺伝子 hucep-3 の発現異常、あるいは HUCEP-3 の機能不全は、脳の高次機能を維持する上で重大な障害となると推測される。

【0036】したがって HUCEP-3 それ自体は虚血性脳疾患やアルツハイマー病、パーキンソン病などの神

経変性疾患の治療薬として有用と考えられる。また、当該蛋白質の機能と同様の機能を有する物質、当該機能を促進する物質、あるいはまた当該遺伝子の発現を促進する物質等の創出に利用することができる。

【0037】以下実施例を挙げて詳述するが、本発明はこの実施例に限定されることは言うまでもない。

【0038】

【実施例】

実施例1 遺伝子 hucep-3 のクローニング

1) 大脳の正常機能の維持に必要な遺伝子の部分配列の決定

ヒト大脳皮質の mRNA(クローンテック社)を錆型として、大久保らの方法(Okubo et al. Nature Genet., 1992, 2, p173)により、大脳皮質の cDNA ライブラリーを作成した。

【0039】次いで、当該ライブラリーから無作為に 770 個の組換え体を選択し、常法(Molecular Cloning, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989、以下同じ)に従って、組換え DNA を抽出し、cDNA 部分の 3' 側の塩基配列を決定した。配列決定には PE アプライドバイオシステムズ社製の DNA シークエンサー(ABI PRISM 377)と同社製反応キットを用いた。770 個の組み換え体中の各 DNA 断片の発現頻度を解析した結果、図 1 に示す配列(配列-1)を有する遺伝子の発現頻度が 2/770 であった。

【0040】2) 配列-1 を含む cDNA 断片のクローニング

配列-1 を含む cDNA 断片のクローニングを以下の方法により行った。

【0041】まず、配列-1 の一部分よりなるオリゴヌクレオチド(図 1; 配列-2)を、PE アプライドバイオシステムズ社製の DNA 合成機(ABI 380B)で合成した。 λ gt11 をクローニングベクターとする、Human Brain cerebral cortex 5'-STRETCH cDNA library(クローンテックラボラトリーズ社製)を、大腸菌 K12 株、Y1090 を宿主として常法に従ってプラーカーを形成せしめた。プラーカーをメンブレンフィルター(アマシャム社製 Hybond-N+)に転写し、DIG(ジゴキシゲニン)で標識した配列-2 のオリゴヌクレオチドをプローブとして、プラーカーハイブリダイゼーション法によって配列-2 を有するファージを取得した。標識には DIG オリゴヌクレオチド・テイリングキット(ベーリンガーマンハイム社製)を使用し、方法は本キットの手順に従った。ハイブリダイゼーションは以下の組成の溶液中で(濃度は全て終濃度)、51°C で 5 時間行った。

【0042】5×SSC

1% Blocking Buffer

0. 1% N-ラウロイルサルコシルナトリウム
0. 02% SDS
50 μg/ml polyA
1 pmol/ml DIG標識合成DNA
ハイブリダイゼーション終了後、メンブレンを2×SSC、0. 1% SDSを用い、5°Cで洗浄した。メンブレン洗浄後、DIG発光検出キット（ベーリングガーマンハイム社製）を使用し、当該キットの手順に従ってメンブレンを処理した。シグナルの検出には、Hyperfilm™-ECL（アマシャム社製）フィルムを使用した。

【0043】プローブとハイブリダイズしたブラークを常法に従って純化し、単一クローナーを得た。当該单一クローナーを増殖せしめ、ファージ粒子よりDNAを抽出、精製した。これらの操作は全て常法に従った。

【0044】3) 塩基配列決定用ベクターへのサブクローニング

2) 精製したDNAを、制限酵素、EcoRIで切断し、同様にEcoRIで切断したベクター、pBlue script II（ストラタジーン社製）にサブクローニングした。Ligation溶液は、宝酒造（株）製のキット（タカラ DNA Ligation Kit Ver. 2）を用い、16°Cで1.5時間反応させた。

【0045】上記反応溶液を用いて常法に従って大腸菌K12株DH5αの形質転換を行った。形質転換体をアンピシリン（Amp）50 μg/ml、5-Bromo

配列-3

5' AGTAGGATCCATGTCTCTCCATTCCCTC

配列-4

5' TAATAGTACTATCATCCCCACTCCCCAAC

実施例1-2) で調製した組換えDNAを錠型とし、配列-3と配列-4のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行った。当該PCR操作は、ストラタジーン社製のPfu DNAポリメラーゼを用い、宝酒造

<反応液組成>

1-3) の組み換えDNA

10×PCR緩衝液

2. 5mM dNTP

10 μM オリゴヌクレオチド（配列-3）

10 μM オリゴヌクレオチド（配列-4）

水

Pfu DNAポリメラーゼ

総量

1 μL

5 μL

8 μL

2 μL

2 μL

31 μL

1 μL

50 μL

<反応条件> 94°Cで1分間保持後、53°Cまで-1°C/2秒の速度で冷却し、53°Cで1分間保持し、更に72°Cで3分間保持した。これを30回繰り返した後、72°Cで10分間保持して、目的のDNAを増幅させた。

【0051】上記方法により増幅されたDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分画、精製した。当該精製cD

-4-Chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal) 40 μg/ml、Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranoside (IPTG) 100 μMを含有するLB寒天培地にプレーティングし、37°Cで一晩培養した。

【0046】白色コロニーを50 μg/mlのAmpを含むLB液体培地10 mlに接種して37°Cで一晩培養し、遠心分離によって菌体を集めた後、QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit（キヤゲン社製）で組換えDNAを精製した。

【0047】4) DNA断片の塩基配列の決定
塩基配列決定にはPEアプライドバイオシステムズ社製のDNAシークエンサーを用い、ダイターミネーター法を用いた。決定された塩基配列を元にしてオリゴヌクレオチドを合成し、プライマーウォーキング法で全塩基配列を決定した（図2）。当該クローナーのcDNAの全塩基配列を図3から図4に示す。当該塩基配列が配列-2を含んでいたことから、目的とする遺伝子（human cerebral protein-3, hucep-3）がクローニングされたことを確認した。

【0048】5) 大腸菌を用いたHUCEP-3の生産
図3に示した配列を元にして配列-3、配列-4のオリゴヌクレオチドを、DNA合成機（PEアプライドバイオシステムズ社製、ABI 380B）で合成した。

【0049】

（株）製のPCRサーマルサイクラーMPを使用して、以下の反応条件で行った。

【0050】

NA断片を、制限酵素BamHIとSmaI（共に宝酒造製）で切断した。切断処理後、再びアガロースゲル電気泳動で分画し、約0.5 kbのDNA断片を精製した（断片-1）。pGEX-4T2（ファルマシア社製）を、制限酵素BamHIとSmaIで切断し、開環ベクター（断片-2）を精製した。断片-1と断片-2を混

合し、実施例1-3)に記載した条件下で、ライゲーションならびに大腸菌K12株DH5株の形質転換を行い、さらに該形質転換体を培養して遠心によって集めた菌体から、組換えDNAを精製した。当該組換えDNA

配列-5

5' GGGCTGGCAAGCCACGTTGGTGGTGG

配列-6

5' CTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG

その結果、当該断片-1の塩基配列が遺伝子hucep-3の塩基配列と同一であること、及び遺伝子hucep-3がpGEX-4T2内のグルタチオンSトランスフェラーゼ遺伝子と同じリーディングフレームで翻訳されることを確認した。このようにして構築した組換えDNAをpGEhucep3と命名した(図5)。pGEhucep3の形質転換体*Escherichia coli* DH5/pGEhucep3は、平成9年2月4日に工業技術院生命工学技術研究所に寄託番号FERM

P-16062として寄託されている。当該組換えDNAを保持する菌体を培養し、適当な条件下に遺伝子発現を誘導すればHUCEP-3をグルタチオンSトランスフェラーゼとの融合蛋白として生産することができる。また、pGEhucep3に組み込まれた遺伝子hucep-3は、制限酵素BamHIと、SalIまたはXbaIとを該組み換えベクターに作用させることで単離され、これを別の適当な発現ベクターに組み換えることもできる。

実施例2 PC12細胞中での遺伝子hucep-3の発現と機能の解析

1) 発現ベクターpREhucep3の構築

実施例1で取得した、pGEhucep3を制限酵素BamHIとXbaI(共に宝酒造製)で切断した。切断処理後、アガロースゲル電気泳動で分画し、約0.5kbのDNA断片を精製した(断片-3)。動物細胞の発現ベクター、pREP10(インビトロジェン社製)を、上記と同様に制限酵素BamHIとXbaIで切断し、開環ベクター(断片-4)を精製した。

【0053】断片-3と断片-4を混合し、実施例1に記載した条件下で、ライゲーションならびに大腸菌K12株DH5株の形質転換を行い、さらに該形質転換体を培養して遠心によって集めた菌体から、組換えDNAを精製した。このようにして構築した組換えDNAをpREhucep3と命名した(図6)。

【0054】2) PC12細胞への導入と安定な形質転換体の取得

PC12細胞を直径60mmのプラスチックシャーレで培養した。シャーレはコラーゲンコートしたものを用い、培地としては5%牛胎児血清、5%ウマ血清、50ユニット/mlペニシリン、50μg/mlストレプト

5×SSC

1%

Blocking Buffer

に挿入された断片-1の塩基配列を、以下に示す配列-5及び配列-6のプライマーを利用し、DNAシーケンサーで決定した。

【0052】

マイシンを含むDMEM(ギブコ社製、以下増殖培地とする)を使用し、37℃、5%CO₂存在下で培養した。

【0055】細胞密度が50%になった時点で、1)で構築したpREhucep3を含むLIPOFECTAMINE試薬(ギブコ社製)を、細胞上に重層して24時間培養した後、増殖培地に置換して24時間培養した。ビベッティングで細胞を分散した後、細胞懸濁液を2等分して直径100mmのプラスチックシャーレ2枚に分注してさらに24時間培養した。

【0056】培地を除いた後、ハイグロマイシンB(カルビオケム社製;終濃度400μg/ml)を含有する増殖培地に置換した。ハイグロマイシンB添加培地を3日毎に交換して2週間培養した。細胞のコロニーが肉眼で確認できるようになった時点で、ステンレスカップを用いてコロニーを5個単離した。対照として用いるためにPC12細胞にpREP10のみを上記と同様にして導入し、安定な形質転換体を5個単離した。

【0057】3) 遺伝子発現の確認

単離した各形質転換体を、24穴のプレートでハイグロマイシンB添加培地(終濃度400μg/ml)で培養し、細胞密度が80%コンフルエントになった時点でビベッティングで細胞を分散して、直径100mmのプラスチックシャーレに接種した。細胞密度が再度80%コンフルエントになった時点で培地を除去し、PBSを添加してセルスクリイパーを用いて細胞を回収した。遠心によって細胞を沈殿させた後に上清を除去し、mRNA抽出キット(ファルマシアバイオテク社製)を用いて細胞からmRNAを精製した。2μgのmRNAを定法に従ってアガロースゲル電気泳動で分画してメンブレン(アマシャム社製Hybond-N+)に転写し、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。プローブとしてはDIG(ジゴキシゲニン)で標識したhucep-3のcDNA断片を用いた。標識にはDIGオリゴヌクレオチド・テイリングキット(ベーリンガー・マンハイム社製)を使用し、方法は本キットの手順に従った。ハイブリダイゼーションは以下の組成の溶液中で(濃度は全て終濃度)、51℃で5時間行った。

【0058】

0. 1% N-ラウロイルサルコシルナトリウム
 0. 02% SDS
 50 μg/ml polyA
 1 pmol/ml DIG標識合成DNA

ハイブリダイゼーション終了後、メンブレンを2×SSC、0. 1%SDS、次いで0. 5×SSC、0. 1%SDSを用い、51°Cで洗浄した。

【0059】メンブレン洗浄後、DIG発光検出キット(ベーリンガーマンハイム社製)を使用し、当該キットの手順に従ってメンブレンを処理した。シグナルの検出には、Hyperfilm™-ECL(アマシャム社製)フィルムを使用した。

【0060】その結果、pREhucep3を導入したPC12細胞のほうがpREP10を導入したPC12細胞よりも、hucep-3遺伝子の発現量が多かった。

【0061】4) NGF除去培地中での増殖
 3)でhucep3遺伝子の高発現を確認することができた安定な形質転換体を増殖培地で培養した。細胞密度が50%になった時点で血清を含まない培地に置換して

配列：

Met	Ser	Leu	His	Ser	Ser	Pro	Thr	Leu	Pro	Thr	Ser	Leu	Tyr	Gln
							5			10				15
Ser	Cys	Asp	Leu	Ser	Val	Gly	Gly	Pro	Ser	Leu	Leu	Thr	Trp	Val
							20			25				30
Trp	Arg	Arg	Glu	Arg	Arg	Cys	Cys	Lys	Val	Phe	Ser	Val	Ser	His
							35			40				45
Cys	Leu	Glu	Ala	Gly	Pro	Ala	Lys	Ala	Trp	Ala	His	Ser	Cys	Thr
							50			55				60
Gly	Ser	Pro	Arg	Gly	Arg	Thr	Gly	Trp	Gly	Ser	Arg	Ala	Cys	Glu
							65			70				75
Ala	Leu	Gly	Lys	Gly	Met	Gly	Leu	Trp	Gly	Arg	Gly	Gly	Met	Gly
							80			85				90
Phe	Arg	Ser	Ile	Cys	Thr	Ile	Arg	Lys	Val	Leu	Arg	Ser	Phe	Phe
							95			100				105
Leu	Glu	Gly	Thr	Leu	Ser	Ser	Leu	Ser	Leu	Phe	Leu	Asp	Leu	Gly
							110			115				120
Leu	Glu	Leu	Arg	Met	Gly	Arg	Cys	Ala	Gln	Gly	Gly	Thr	His	Gln
							125			130				135
Ser	Thr	Arg	Glu	Gly	Gly	Tyr	Leu	Gly	Val	Ser	Gln	Gly	Leu	Cys
							140			145				150
Gln	Cys	Leu	Gln	Pro	Thr	Ser	Arg	Ser	Leu	Glu	Phe	Gly	Glu	Trp
							155			160				165
Gly														
							166							

【0063】

【配列表】

配列番号 (SEQ ID NO) : 2

配列の長さ：498塩基

配列

3日間培養し、MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) 法 (Mosman, T., J. Immunol Methods 65, 55-59 (1985)) で生存細胞数を測定した。pREhucep3を導入したPC12細胞は、対照として用いた、pREP10導入細胞に比べて生存細胞数が有意に多かった。

【0062】

【配列表】

配列番号 (SEQ ID NO) : 1

配列の長さ：166残基

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

	10	20	3
0	40	50	
	ATGTCTCTCC	ATTCCCTCTCC	AACCCCTGCC
C	ACCTCCCTGT	ACCAGAGCTG	50
	TGATCTCTCG	GTGGGGGGCC	CATCTCTGC
T	GACCTGGGTG	TGGCAGGAGGG	100
	AGAGGGCGATG	CTGCAAAGTG	TTTCTGTG
T	CCCACGTCT	TGAAGCTGGG	150
	CCTGCCAAAG	CCTGGGCCCA	CAGCTGCAC
C	GGCAGCCAA	GGGGAAGGAC	200
	CGGTTGGGGG	AGCCGGGCAT	GTGAGGCC
T	GGGCAAGGGG	ATGGGGCTGT	250
	GGGGGCGGGG	CGGCATGGC	TTCAGAAGT
A	TCTGCACAAT	TAGAAAAGTC	300
	CTCAGAACGCT	TTTTCTTGGA	GGGTACACT
T	TCTTCACGT	CCCTATTCT	350
	AGACCTGGGG	CTTGAGCTGA	GGATGGGAC
G	ATGTGCCAG	GGAGGGACCC	400
	ACCAGAGCAC	AAGAGAAAGGT	GGCTACCTG
G	GGGTGTCCA	GGGACTCTGT	450
	CAGTGCCTTC	AGCCCACCAAG	CAGGAGCTT
G	GAGTTTGGGG	AGTGGGGA	498

【図面の簡単な説明】

【図1】図1の配列-1は、大脳皮質のcDNAライブラリーより得られる組み換え体中で高い発現頻度を示すDNA断片を表わし、配列-2は、配列-1を含むDNA断片のクローニングに用いたオリゴヌクレオチドを示す。

【図2】遺伝子huccep-3の塩基配列決定の方法を示す。

【図3】遺伝子huccep-3の塩基配列及びそれによ

ってコードされるアミノ酸配列を示す。

【図4】図3の続きであり、遺伝子huccep-3の塩基配列及びそれによってコードされるアミノ酸配列を示す。

【図5】組み換えベクターpGEhuccep3の構築を示す。

【図6】発現ベクターpRehuccep3の構築を示す。

【図1】

配列-1

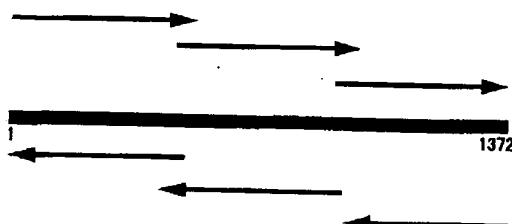
5' G A T C T C T T T T C A G A A G T G T C T A T A G A A C A A
T A A A A A T C T T T N A C T T C T G A C C T T G A A A A

配列-2

5' G A T C T C T T T T C A G A A G T G T C T A T A G A A C A
A T A A A A A T C T T

【図2】

塩基配列決定の方法



【図4】

CCAGGGACTCTGTCAGTGCCTTCACCCACCAAGCAGGAGCTGGACTTTGGGAGTCGGG
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 GlnGlyLeuCysGlnCysLeuGlnProThrSerArgSerLeuGluPheGlyGluTrpGly

 ATGACTCCGTCAAGCACAACTGTTCTCTGACTGGAACCAAAGAACGAAAGCAGGAGCTAGGACC
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
 End

 CCCAGTCCTGCCCGGAGGACACAAAGCAGGGTCCCTCACTCAAGGCAGTGGGATGGC
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960

 GGCTGAGGAACGGGGCAGGCAAGGTCACTGCTCAGTCACGTCCACGGGGACGAGCCGTG
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020

 CGTTCTGCTCAGTAGCTGGAGCTCATTCCTTCTCCAAGCTTGGAACTGTTTGAAAGAT
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080

 AACACAGAGGGAAAGGGAGAGCCACCTGGTACTTGTCCACCCCTGCCCTCTGTTCTGAA
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140

 ATTCCATCCCCCTCAGCTTAGGGGATGCACCTTTCCCTTCTCACTTTGCAT
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200

 GTTTTACTGATCATTGATATGCTAACCGTTCTCAGCCCTGACCTTGGAGAGGGC
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260

 TGTAAACGCCCTCAGTCAGTCTGGGATGAAACTCTTAATGCTTGTATATTTCTCA
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320

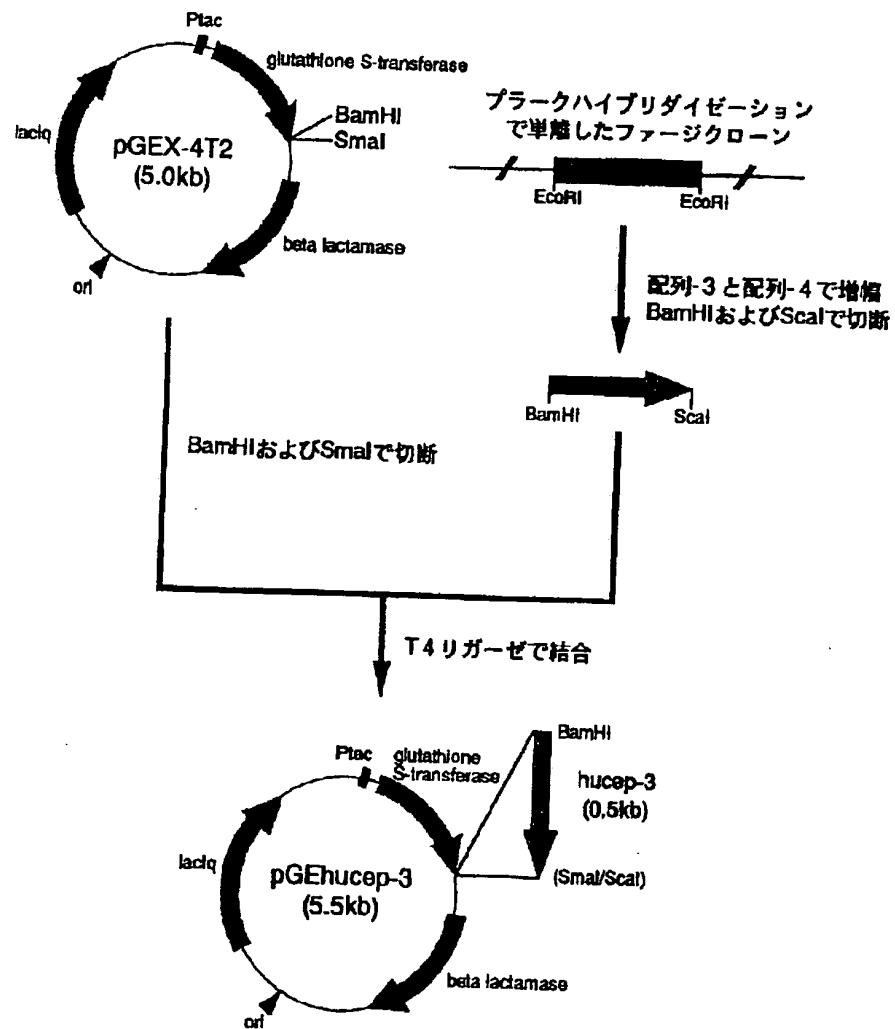
 ATTAGATCTTTTCAGAACTGCTATAGAACAAATAAAAATCTTTACTCCG
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1372

【図3】

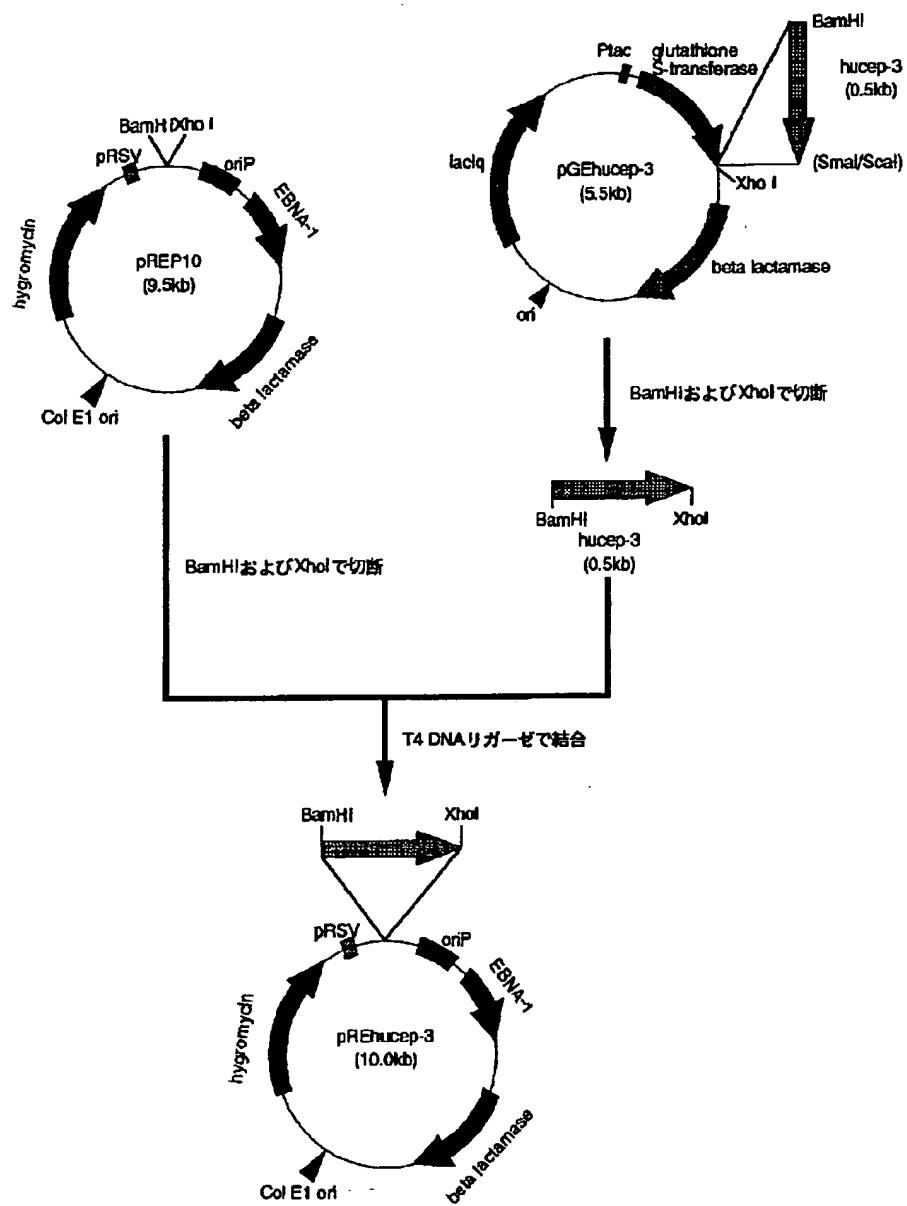
1 CGGACGTACATCATCCAGGAGGAGATGGTGGTCACGGACATGTCAGTGACAAGGAGGCC
 60
 61 CTGGGGTCCCTCATCTACCACCTGTGCAACGGAAAGACACCTACCGGCTCCGGCGCCGG
 120
 121 GCAACGGGAGGCCATCAACAAGCTCCCCAACAACTGCAATCCCATCCGCCACTTC
 180
 181 GAGAACACCTTCGTGGAGACGGTCATCTGGGGGTGGTGAGGCCCTCCTCCCCA
 240
 241 GAACCCCTGCCGTGTTCTCTTCTTCCCGCTCTCTGGCCCTCCTCCCTCC
 300
 301 CCCTGCTTAGCTTGTACTTGGACGGCTTCTATAAGAGTGAACATGTCCTCCATTC
 360
 MetSerLeuHisSerSer
 381 TCCAACCTGCCAACCTCCCTGTACAGAGCTGTGATCTCTCGGTGGGGGCCATCTCT
 420
 ProThrLeuProThrSerLeuTyrGlnSerCysAspLeuSerValGlyGlyProSerLeu
 421 GCTCACCTGGGTGTCGGGGAGGGAGAGGGCATGCTGCAAAGTGTCTGTGTCCCCACTG
 480
 LeuThrTrpValTrpArgArgGluArgArgCysCysLysValPheSerValSerHisCys
 481 TCTTGAACCTGGGCTGCCAAAGCCTGGGCCACAGCTGCACCGGCAAGCCCAAGGGCAAG
 540
 LeuGluAlaGlyProAlaLysAlaTrpAlaHisSerCysThrGlySerProArgGlyArg
 541 GACCGGTTGGGGAGCCGGCATGTCAGGCCCTGGCAAGGGATGGGCTGTGGGGCG
 600
 ThrGlyTrpGlySerArgAlaCysGluAlaLeuGlyLysMetGlyLeuTrpGlyArg
 601 GGGGGCATGGCTTCAGAAGTATGCCACAATTAGAAAAGTCCTCAGAAGCTTTCTT
 660
 GlyGlyMetGlyPheArgSerIleCysThrIleArgLysValLeuArgSerPhePheLeu
 661 GGAGGGTACCTTCTTCACTGTCCTATTCCTAGACCTGGGGCTTGAGCTGAGGATGGG
 720
 GluGlyThrLeuSerSerLeuPheLeuAspLeuGlyLeuGluLeuArgMetGly
 721 ACCATGTCCCCAGGGAGGGACCCACCAAGCACAAGAGAAGCTGGCTACCTGGGGCTGTC
 780
 ArgCysAlaGlnGlyGlyThrHisGlnSerThrArgGluGlyGlyTyrLeuGlyValSer

次頁へ続く

【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁶
// A 61 K 38/00

識別記号
AAB
AAM
ADT

F I
A 61 K 37/02

AAB
AAM
ADT

(C 12 N 1/21
C 12 R 1:19)
(C 12 N 5/10)

C 12 R 1:91)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:19)

(72)発明者 高山 喜好
東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製
薬株式会社内